

外源性一氧化碳对大鼠脑内源性气体信使系统的影响

王耀宏¹, 赵金垣^{1*}, 崔书杰², 邓敏¹, 温韬¹, 刘和亮¹

(1. 北京大学第三医院职业病研究中心, 北京 100083; 2. 平顶山市职业病防治所, 河南 平顶山 467000)

摘要: 目的 探讨外源性一氧化碳对脑内气体信使系统的影响, 为迟发性脑病机制的研究提供新思路。方法 体重 240~280 g 雄性 SD 大鼠腹腔单次注射染毒, 分别于染毒前及染毒后 0.5、1、2、4、8 h, 颈静脉取血测定血浆 NO 及 cGMP 含量; 取双侧脑海马组织, 测定 HO、NOS 活性和 cGMP 含量。结果 染毒后脑循环中 NO-cGMP 通路一过性上调, 随后抑制; 脑海马组织中 HO、NOS 活性下降和 cGMP 含量降低。结论 急性一氧化碳中毒可引起体内气体信使系统功能失衡, 这可能是急性一氧化碳中毒有别于其他缺氧性脑损伤的重要病理生理机制之一。

关键词: 急性一氧化碳中毒; 一氧化氮(NO); 环磷酸鸟苷(cGMP); 血红素加氧酶(HO); 一氧化氮合酶(NOS)

中图分类号: R595. 1; R33 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)05-0261-04

Effect of exogenous carbon monoxide on endogenous gaseous messenger system in brain of rat

WANG Yao-hong¹, ZHAO Jin-yuan^{1*}, CUI Shu-jie², DENG Min¹, WEN Tao¹, LIU He-liang¹

(1. *Research Center of Occupational Medicine, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China*; 2. *Pingdingshan Municipal Institute for Prevention and Treatment of Occupational Diseases, Pingdingshan 467000, China*)

Abstract: Objective To explore the effect of exogenous carbon monoxide on endogenous gaseous messenger system in brain, thereby to find a new clue for pathogenesis study of the delayed encephalopathy by acute CO poisoning. **Method** Male SD rats, BW240—280 g, were ip injected with CO repeatedly, then the levels of NO and cGMP in cervical vein blood were dynamically monitored; while the activities of HO, NOS and the level of cGMP in Hippocampi of rats were also measured. **Result** After injection of CO, NO-cGMP level in brain-circulatory plasma obviously decreased following a transient increase; the activities of HO or NOS, and the cGMP level in hippocampi were also decreased. **Conclusion** There was some disequilibrium between gaseous messenger system during acute CO poisoning, that might be one of the most important pathophysiological mechanisms for brain damage by acute CO poisoning.

Key words: Acute CO poisoning; Nitric oxide (NO); Cyclic guanosine monophosphate (cGMP); Heme oxygenase (HO); Nitric-oxide synthase (NOS)

一氧化碳中毒后出现迟发性脑病(DNS)当然与一氧化碳中毒密不可分。目前关于CO的毒性机制主要有两种学说,一是将CO中毒归结为CO与血红蛋白结合后引起的缺氧;另一种则认为应重视CO的直接毒性作用^[1,2]。缺氧学说是近百年CO毒理机制研究中的主导学说。直接毒性学说认为,CO可能与其他色素蛋白结合而产生毒性效应,这种效应可能是造成CO中毒与单纯缺氧在损伤的病理学和临床表现方面存在明显差异的主要原因。

研究表明,一氧化氮(nitric oxide, NO)在神经系统各种病理生理过程中占据重要地位,特别是脑的缺血缺氧性疾病^[3]。近年的研究进一步证实,机体本身还可以产生一氧化碳(CO),此种内源性CO已成为体内气体信使系统又一重要成员^[4]。一氧化碳及其

合成酶系统(CO-HO)与一氧化氮及其合成酶系统(NO-NOS)的生理学、病理学作用均非常相似,本文的目的是研究他们在急性一氧化碳中毒、机体有外源性CO侵入情况下各自的变化,探索其在CO中毒致脑损伤,尤其是在DNS发病中的作用,以为彻底弄清急性CO中毒性迟发脑病的具体机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 急性CO中毒模型制备及生物标本采集

雄性SD二级大鼠,体重240~280g,由医科院实验动物中心供应,于本校动物室商品化干块料饲养,自由食水,实验前一天禁食。采用单次腹腔注射CO气体(120 ml/kg),制备急性CO中毒模型;改良双波长法定量测定尾静脉血碳氧血红蛋白(HbCO)浓度^[5]。分别于注射前,注射后0.5、1、2、4、8h,在乙醚麻醉下,经颈静脉采血,分离血浆, -80℃冰箱冻存待测一氧化氮代谢产物NO²⁻及环磷酸鸟苷(cGMP)。采血后立即断头取脑,冰浴下迅速分离双侧海马,投入液氮,待测脑组织中cGMP含量及NOS

收稿日期: 2003-07-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(课题编号: 30070651)

作者简介: 王耀宏(1973-), 博士研究生, 现在美国田纳西州孟菲斯大学。

*责任作者 (corresponding author):

及 HO 活性。

CO 纯品气体 (99.95%) 由北京康福气体公司提供, ¹²⁵I-cGMP 放免试剂盒由上海中医药大学同位素室提供, NOS 检测试剂盒由北京邦定生物技术公司提供; 其余试剂均为市售分析纯产品。

1.2 脑海马组织 HO 活性测定⁶⁾

1.2.1 脑海马组织微粒体制备 取脑海马组织, 按 1:3 体积加入 0.02 mol/L、pH 7.4 的磷酸钾缓冲液 (含 0.1 mmol EDTA, 135 mmol KCl), 制备匀浆 (Potter 匀浆器), 4 °C 13 000 g 离心 20 min (日立 RPR 20-3 型高速低温离心机), 取上清, 注意将上清液面漂浮的脂质弃去; 再次 4 °C 105 000 g 离心 1 h, 沉淀部分用 pH 7.4、0.02 mol/L 磷酸钾缓冲液悬浮, 待测。

1.2.2 脑海马组织匀浆液中 HO 活性测定 冰浴下, 取脑海马组织微粒体 0.5 mg, 加入胆绿素还原酶 4 mg、NADPH (终浓度 0.8 mol/L)、6-磷酸葡萄糖 (终浓度 4 mmol/L)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (1U)、血红素 (终浓度 20 μmol/L), 加入 pH 7.4 磷酸钾缓冲液至 1 ml, 充分混匀, 于 37 °C 水浴, 避光反应 20 min, 冰浴终止反应。然后用双波长分光光度计测定 OD₄₆₃ 和 OD₅₃₀ 的吸光度差值, 以生成的胆红素 nmol/(mg pro·h) 来表示 HO 活性单位, 如消光值为 40, 则为 OD₄₆₃ 和 OD₅₃₀ 差值 × 40 / (mg pro·h) 单位。对照管以磷酸钾缓冲液替代脑海马组织微粒体。

1.3 血浆一氧化氮 (NO) 的测定

采用 Griess 法测定颈静脉血浆亚硝酸盐含量 (参见第 258 页 1.3.4)

1.4 脑海马组织 NOS 活性的检测

采用北京邦定生物技术公司出品的试剂盒测定。取脑海马组织, 冰浴下匀浆, 4 °C 12 000 g 离心 15 min 取上清, 按照试剂盒说明书进行测定。酶活性定义为每毫克组织蛋白每分钟生成的 1 nmol NO 为一个活性单位 (U)。

1.5 cGMP 含量放射免疫测定

采用上海中医药大学提供的¹²⁵I-标记的 cGMP 放免药盒, 按药盒说明书进行测定。血浆 cGMP 含量以 pmol/ml 表示, 组织 cGMP 含量以 pmol/mg pro 表示。

1.6 统计学分析

实验数据以均值 ± 标准差表示, 采用 SPSS8.0 统计软件进行单因素方差分析, 组间进行 q 检验。

2 结果

2.1 大鼠注射 CO 后尾静脉血 HbCO 浓度变化

从表 1 可见, 腹腔注射 CO 后, 血中 HbCO 浓度

迅速升高, 0.5 h HbCO 浓度即升至峰水平 (显著高于染毒前, $P < 0.01$), 8 h 后恢复至染毒前水平。

2.2 大鼠注射 CO 后颈静脉血 NO-cGMP 含量变化

2.2.1 大鼠注射 CO 后血浆 NO 浓度测定结果 大鼠注射 CO 后 0.5 h, 血浆 NO 浓度显著升高 ($P < 0.01$), 但随后即迅速下降, 并持续维持低水平状态, 与染毒前相比差异有非常显著性 ($P < 0.01$), 8 h 仍低于染毒前水平 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.2.2 大鼠注射 CO 后血浆 cGMP 浓度变化 大鼠注射 CO 后 0.5 h, 血浆 cGMP 浓度急剧升高 ($P < 0.01$), 随后即迅速降低, 注射 CO 后 8 h 仍显著低于染毒前水平 ($P < 0.01$), 变化趋势与 NO 完全一致。

表 1 大鼠染毒后血 HbCO、NO 及 cGMP 浓度变化

Tab 1. Changes of HbCO, NO and cGMP levels in plasmas of CO exposed rats

时间	血 HbCO 浓度 (%)	血浆 NO (μmol/L)	血浆 cGMP (pmol/ml)
染毒前	2.95 ± 1.93	49.16 ± 4.69	69.86 ± 7.44
染毒后 0.5 h	74.12 ± 2.69**	77.61 ± 5.91**	98.91 ± 9.27**
1 h	78.45 ± 3.77**	30.68 ± 5.36**	54.90 ± 8.15**
2 h	75.39 ± 3.15**	32.89 ± 6.09**	42.35 ± 6.39**
4 h	55.19 ± 3.98**	30.44 ± 4.93**	28.07 ± 8.91**
8 h	4.09 ± 3.53	40.87 ± 6.97*	38.02 ± 9.76**

* 与染毒前比较 $P < 0.05$, ** 与染毒前比较 $P < 0.01$, $n = 6$;
表 2 同。

* $P < 0.05$ comparing with that of pre-injection of CO; ** $P < 0.01$, comparing with that of pre-injection of CO, $n = 6$. The same in table 2.

2.3 大鼠注射 CO 后脑海马组织 HO、NOS 活性及 cGMP 含量变化

表 2 可见, 大鼠注射 CO 后 0.5 h, 脑海马组织 HO、NOS 活性即有显著降低, 与染毒前相比差异非常显著 ($P < 0.01$), 直至 8 h 仍未恢复正常 ($P < 0.05$)。

大鼠注射 CO 后 0.5 h, 脑海马组织 cGMP 含量即见降低 ($P < 0.05$), 至 1 h 时与染毒前有非常显著差异 ($P < 0.01$), 8 h 时方有所恢复。

表 2 大鼠染毒后海马 HO、NOS 活性及 cGMP 浓度的变化

Tab 2. Changes of HO, NOS activities and cGMP levels in Hippocampi of CO exposed rats

时间	HO 活性 (U/mg pro)	NOS 活性 (U/mg pro)	cGMP 含量 (μmol/mg pro)
染毒前	38.25 ± 4.36	0.32 ± 0.081	466.19 ± 125.94
染毒后 0.5 h	19.34 ± 4.98**	0.20 ± 0.053**	309.58 ± 109.37**
1 h	10.09 ± 6.31**	0.15 ± 0.049**	226.38 ± 115.82**
2 h	11.16 ± 6.81**	0.19 ± 0.058**	257.79 ± 116.82*
4 h	10.72 ± 4.78**	0.17 ± 0.083**	290.93 ± 137.50*
8 h	27.95 ± 7.85*	0.22 ± 0.091*	393.07 ± 149.87

3 讨论

3.1 NO-NOS系统变化及其在急性CO中毒中的意义

NO是一种小分子气体,不易溶于水,可自由穿过细胞膜,作用于细胞内的靶分子;它即可作为生物信使分子完成多种生理功能,如作为非经典性神经递质参与脑的学习和记忆过程,作为血管舒张因子调节血管张力等,同时又是自由基而具有毒性作用,故其作用具有双重性^[7]。体内NO主要由一氧化氮合酶(NOS)催化L-精氨酸生成,其代谢产物主要是硝酸盐和亚硝酸盐。

本研究显示,在急性一氧化碳中毒早期,随着外源性CO大量进入体内及血液中碳氧血红蛋白(HbCO)浓度升高,颈静脉(脑循环)血液中NO亦在一过性迅速升高后急剧下降,并持续维持低水平,至体内血HbCO浓度回复至正常水平时,仍未恢复。其他原因引起的缺血缺氧性脑损伤过程中,均见有NOS迅速激活现象,其产生的NO引起的舒血管效应可能具有一定的代偿作用^[7];而在一氧化碳中毒过程中,NOS的活性始终处于抑制状态,甚至连与NO相对应的一过性增高过程也没有。脑海马NOS活性的此种抑制状态在血中HbCO恢复正常后仍持续存在,提示组织中CO的清除远较血中CO的排出为慢。

NOS本身是一种血红素类蛋白,外源性CO可能与其铁卟啉环中的铁结合而导致其活性抑制。内源性NO和CO的作用靶分子同为血红素辅基的铁中心,两者间实际上存在着相互竞争的现象;故当外源性CO大量进入机体后,亦必将与内源性NO争夺靶位点,而使游离NO增高,这可能是中毒早期血浆中NO一过性升高、呈现酶活性与产物分离现象的主要原因。但NO的生物半衰期甚短,故当外源性CO大量进入机体造成NOS活性抑制后,脑循环血浆中游离NO在短暂升高后很快下降,并持续维持低水平状态。cGMP是游离的NO激活平滑肌细胞内鸟苷酸环化酶的代谢产物,其可引起脑血管扩张,过量的NO亦可通过负反馈作用抑制NOS活性,限制NO生成^[8]。本实验显示,cGMP的变化趋势与NO完全一致,进一步表明急性CO中毒后,NO的扩血管效应的明显抑制,这可能是一氧化碳中毒性脑损伤程度远重于其他缺氧性脑损伤的原因之一。

3.2 CO-HO系统变化及其在急性CO中毒中的意义

血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)是体内合成内源性CO的惟一酶系统,其主要功能是将血红素代谢为胆绿素,并生成一氧化碳和游离铁

(Fe^{2+})^[4,9]。HO在体内有HO-1、HO-2、HO-3三种同工酶,HO-1为诱导型HO,亦称热休克蛋白32(HSP32),许多诱导因素均可引起其活性及生成增加;HO-2是组成型酶,其作用多认为与CO的神经信使作用有关;HO-3分布较广泛,活性很弱,在近年刚刚被发现,对其性质及功能了解尚不多。HO的生物学意义主要表现在其代谢产物上,如胆绿素、胆红素均是体内的强抗氧化剂,CO是气体信使分子,在神经元信息传递和血管紧张度调节中起重要作用,而 Fe^{2+} 则是体内具有多种生物学活性的金属^[4,9]。由于CO-HO系统也是机体铁代谢中重要的酶系统,故CO中毒主要累及脑组织含铁丰富的区域,如基底结区,CT与MRI均显示该区域有铁的沉积^[10];若CO-HO系统持续紊乱,甚至可能导致铁代谢异常。

目前的研究表明,HO-1的诱导是氧应激的一种普遍标志,它产生的胆色素、CO对细胞具有保护作用^[4,9],在各种类型的缺氧性脑损伤中,都可以观察到HO-1活性的上调;但本文观察到的情况则是一个例外,提示CO中毒引起的缺氧与其他类型缺血缺氧相比更有独特之处。因吸入的外源性CO分子与HO代谢生成的CO在化学上应属一类物质,但此种外源性CO的数量远远高于内源性、生理剂量范畴的CO量,故对HO主要为负反馈性抑制作用,其结果是导致内源性CO生成量明显下降。

从总体上看,机体HO活性的变化应是缺氧的诱导效应与CO中毒反馈性抑制效应的加和,组织中的CO总量则应是组织中游离的外源性CO与内源性CO的加和。本研究结果显示,在急性CO中毒过程中,HO的活性并未被CO造成的缺氧及自由基大量产生等生化改变所诱导,而是始终处于受抑制状态,提示当大量外源性CO进入机体造成CO中毒时,机体HO系统主要呈现CO的抑制效应,亦验证了外源性CO与内源性CO在体内气态信使系统效用本质上的同一性。

3.3 气体信使系统功能变化在一氧化碳中毒机制研究中的意义

如前所述,缺氧说与细胞毒性说是目前一氧化碳中毒机制的两个主要假说,两种学说均有难以解释的病理生理现象。本研究显示,CO中毒可使体内内源性气体信使系统发生显著变化,并导致其下游的细胞信号分子随之发生改变。显然,CO的损伤效应不能仅归结为CO造成的组织缺氧,至少不能排除此种外源性CO具有干扰内源性细胞信使分子(NO、CO)功能的毒性效应,即CO中毒所引(下转第267页)

面, S9 本身对培养细胞具有一定的毒性, 在加入 S9 的平皿中, 有少许细胞悬浮, 表面颗粒增多, 细胞有轻度受损, 不能保持正常的融合状态, 细胞之间的正常连接必然受到影响, GJIC 势必受到抑制。

本实验中观察到 TPA 对 GJIC 抑制作用迅速且持续加重, 存在明显的剂量-反应和时间-反应关系, 当 TPA 剂量及染毒时间到了一定的极限, GJIC 功能的抑制不再明显增加, 在停止使用后, 加入新鲜培养液, 细胞通过自我调节, 有一定程度的恢复。TPA 对细胞 GJIC 功能抑制的确切机制及其在 TPA 致癌过程中的作用尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Zeiger E, Haworth S, Speck W, et al. Phthalate ester testing in the national toxicology program's environment mutagenesis test development program [J]. *Environ Health Perspect*, 1982, 45: 99-101.
- [2] Kozumbo WJ, Krou R, Rubin RJ. Assessment of the mutagenicity of phthalate esters [J]. *Environ Health Perspect*, 1982, 45: 103-109.
- [3] Heck HD, Tyl RW. The induction of bladder stones by terephthalic acid dimethyl terephthalate, and melamine (2, 4, 6-triamino-s-triazine) and its relevance to risk assessment [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1985, 5: 294-313.
- [4] El-Fouly MH, Trosko JE, Chang CC. Scrape-loading and dye transfer: a rapid and simple technique to study gap junctional intercellular

communication [J]. *Exp Cell Res*, 1987, 168: 422-430.

- [5] Loewenstein WR. Junctional intercellular communication the cell-to-cell membrane channel [J]. *Physiol Rev*, 1981, 62: 829-834.
- [6] Chaudhuri R, Sigler K, Dupont E, et al. Gap junctional intercellular communication in mouse lung epithelial cell lines: effect of cell transformation and tumor promoters [J]. *Cancer Lett*, 1993, 30: 11-18.
- [7] Linnaimma K, Pelin K, Vanhala E, et al. Gap junctional intercellular communication of primary and asbestos-associated malignant human mesothelial cells [J]. *Carcinogenesis*, 1993, 14 (8): 1597-1602.
- [8] Yanasaki H, Ashby J, Bignami M, et al. Nongenotoxic carcinogens; development of detection methods based on mechanisms: a European project [J]. *Muta Res*, 1996, 353 (12): 47-63.
- [9] Combettes L, Tran V, Tordjman TB, et al. Ca^{2+} -mobilizing hormones induce sequentially ordered Ca^{2+} signals in multicellular systems of rat hepatocytes [J]. *Biochem J*, 1994, 304: 585-594.
- [10] 龚楠, 徐锡坤, 王心如. 对苯二甲酸的遗传毒性 [J]. *中国公共卫生学报*, 1999, 18 (4): 203-204.
- [11] 漆少廷, 王心如, 徐锡坤, 等. 对苯二甲酸诱导大鼠膀胱结石与膀胱癌的研究 [J]. *卫生研究*, 2002, 31 (1): 10-12.
- [12] 邱清, 徐锡坤, 王心如, 等. 对苯二甲酸经口染毒大鼠早期生物学效应的探讨 [J]. *南京医科大学学报*, 1994, 14 (2): 131-134.
- [13] 漆少廷, 王心如, 徐锡坤, 等. 对苯二甲酸诱导大鼠泌尿系统结石的成分分析 [J]. *卫生研究*, 2002, 31 (2): 76-78.
- [14] 张恒东, 徐锡坤, 龚楠, 等. 对苯二甲酸对 NIH-3T3 细胞毒性的研究 [J]. *中国工业医学杂志*, 2001, 14 (2): 65-67.

(上接第 263 页)

起的外源性 CO 侵入可能导致病理性信号传导通路的持续紊乱, 从而在时间、空间上造成多层次、多环节的病理性改变。

本实验摒弃原有的、仅将 CO 视作窒息性气体的研究套路, 将外源性 CO 与新近发现的气态信使分子 NO、CO 从生理学和毒理学角度进行了细致比较, 并引入 NOS、HO 等上述气态信使分子的合成酶系统作为深入推进此一领域研究的新视角, 从而使急性 CO 中毒分子机制的研究进入一个全新的领域, 此一探索可能具有重要的理论价值和实际意义, 值得进一步追踪拓展。

参考文献:

- [1] Raub JA, Mathieu NF, Hampson NB, et al. Carbon monoxide poisoning—a public health perspective [J]. *Toxicology*, 2000, 145 (1): 1-14.
- [2] Walker E, Hay A. Carbon monoxide poisoning [J]. *BMJ*, 1999, 319: 1082-1083.
- [3] Hirabayashi H, Takizawa S, Fukuyama N, et al. Nitrotyrosine generation

via inducible nitric oxide synthase in vascular wall in focal ischemia reperfusion [J]. *Brain Res*, 2000, 852: 319-325.

- [4] 陈莉, 赵金垣. 一种新的细胞信息分子——一氧化碳 [J]. *中华内科杂志*, 1999, 38 (4): 270-272.
- [5] 冯仁丰. 实用医学检验学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996. 72.
- [6] Christova T, Duridanova D, Braykova A, et al. Heme oxygenase is the main protective enzyme in rat liver upon 6-day administration of cobalt chloride [J]. *Arch Toxicol*, 2001, 75 (8): 445-451.
- [7] Puisieux F, Deplanque D, Pu Q, et al. Differential role of nitric oxide pathway and heat shock protein in preconditioning and lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2000, 389: 71-78.
- [8] Bolanos JP, Almeida A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1999, 1411: 415-436.
- [9] Maines MD. The heme oxygenase system and its functions in the brain [J]. *Cell Mol Biol*, 2000, 46 (3): 573-585.
- [10] Inagaki T, Ishino H, Seno H, et al. A long-term follow-up study of serial magnetic resonance images in patients with delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning [J]. *Psychiatry Clin Neurosci*, 1997, 51 (6): 421-423.